Aus dem Institut für Klinische Physiologie
Direktor: Professor Dr. med. K. Hierholzer
des Fachbereiches Universitätsklinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin

Corticosteronmetabolismus in der Glandula submandibularis der Ratte in vitro

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Verowski, Alexander
aus Wilna/UdSSR

19 85

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
Direktor: Professor Dr. med. K. Hierholzer
des Fachbereiches Universitätsklinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin

Corticosteronmetabolismus in der Glandula submandibularis der Ratte in vitro

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnarzt Verowski, Alexander
aus Wilna / UdSSR

Referent: Prof. Dr. K. Hierholzer
Korreferent: Prof. Dr. B. Kempfle

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 13. 12. 1985

Meinen Eltern gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549619_0071

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Abkürzungen	
	Verzeichnis der Abbildungen	
	Verzeichnis der Tabellen	
1.	Zusammenfassung	9
2.	Einleitung	11
2.1.	Speicheldrüse und Steroide	11
2.2.	Fragestellung	11
3.	Versuchstiere und Methoden	13
3.1.	Versuchtiere	13
3.2.	Operationstechnik	13
3.3.	Aufbereitung des Gewebes	13
3.4.	Inkubation mit Corticosteron	14
3.5.	Analysen	15
3.5.1.	Hormonnachweis	15
3.5.2.	Biologisches Material	15
3.5.3.	Extraktion der Corticosteroide	15
3.5.4.	Chromatographische Trennung	16
3.5.5.	Bestimmung der Radioaktivität	17
3.5.6.	Technik der Datenauswertung	18
4.	Ergebnisse	19
5.	Diskussion	29
6.	Tabellarischer Anhang	36
7.	Literaturverzeichnis	54
8.	Firmenadressen	58
	Lebenslauf	59

Abkürzungen

B	Corticosteron (11ß,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion)
cpm	counts per minute
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
Lsg.A	Elutionslösung A
Lsg.B	Elutionslösung B
Met I/II/IV	Metabolit I/II/IV

Verzeichnis der Abbildungen

		Seite
Abb. 1	Ergebnisse eines typischen Experimentes nach 30 und 60 min Inkubationsdauer von Gewebsschnitten mit B	21
Abb. 2:	UV-Chromatogramm einer Probe, die nur ein Gemisch von Referenzsteroiden enthielt	23
Abb. 3:	Vergleich des Metabolismus von Corticosteron und der Zunahme von Met IV in Speicheldrüsen von männlichen und weiblichen Ratten	24
Abb. 4:	Vergleich des Metabolismus von Corticosteron und der Zunahme von Met IV in Gewebsschnitten (Leber, Niere, Speicheldrüse) männlicher Ratten	28

Verzeichnis der Tabellen

		Seite
Tab. 1:	Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung	36
Tab. 2:	Zusammensetzung des Inkubationsmediums	37
Tab. 3:	Komponenten und Betriebsparameter des HPLC-Systems	38
Tab. 4:	Übersicht über die verschiedenen chromatographischen Verfahren	40
Tab. 5:	Übersicht über die verwendeten Tiere	42
Tab. 6:	Prozentuale Abnahme der B-Konzentration und prozentuale Zunahme der Metabolit-Konzentration im Speicheldrüsengewebe in vitro	46

1. Zusammenfassung

Homogenisiertes und mit Kollagenase aufbereitetes Gewebe der Glandulae submandibulares von Ratten wurde für die Dauer von 60 Minuten im Inkubationsmedium inkubiert. Das Inkubationsmedium bestand aus Krebs-Henseleit-Lösung, Na-Laktat, markiertem und nicht markiertem Corticosteron. Die lipidlöslichen Hormone der einzelnen Proben wurden an Extrelut adsorbiert und mit Äther extrahiert. Die extrahierten Hormone wurden zusammen mit Referenzhormonen mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie aufgetrennt. Die Retentionszeiten der exogenen Referenzsteroide wurden durch UV-Absorption gemessen. Die Retentionszeiten des markierten Corticosterons und seiner Metabolite wurden zusätzlich durch Messung der Radioaktivität fraktioniert gesammelter Proben gemessen.

Es hat sich gezeigt, daß im Laufe der Inkubationsdauer der Aktivitätspeak von Corticosteron an Höhe abnimmt. Währenddessen entstanden an anderen chromatographischen Positionen Aktivitätspeaks, deren Höhe mit der Zeit zunahm. Dabei waren ein Aktivitätspeak auf der Seite geringerer Polarität und zwei Aktivitätspeaks auf der Seite stärkerer Polarität von Corticosteron. Dies weist auf das Entstehen von mindestens drei lipidlöslichen Metaboliten aus Corticosteron hin. Der auf der Seite geringerer Polarität befindliche Peak zeigte die stärkste Aktivitäts-Zunahme. Die Retentionszeit dieses Aktivitätspeaks war identisch mit der Position des Met IV, der bereits als 11-dehydro-Corticosteron identifiziert wurde. Die auf der Seite stärkerer Polarität in geringerer Höhe entstandenen Peaks entsprechen den

Metaboliten I und II und wurden als 11-dehydro-20ß-dihydro-B und 20-dihydro-B indentifiziert. Daraus ergibt sich, daß Corticosteron in der Gl. submandibularis hauptsächlich in den Met IV umgewandelt wird. Die Met I und II entstehen nur in sehr geringer Menge.

Untersuchungen an männlichen und weiblichen Tieren ergaben keinen geschlechtsspezifischen Unterschied. Die Metabolisierungsrate ließ sich weder durch Metyrapon noch durch Enzyminduktion mit Phenobarbital steigern. Drei Pilotversuche mit Speicheldrüsen von männlichen Feldmäusen ergeben, daß auch hier hauptsächlich der Met IV aus B entsteht.

Bei gleichzeitig durchgeführten Versuchen an Leber- und Nierenschnitten zeigte sich, daß in diesen Organen entstehende Metabolite auch in der Speicheldrüse gebildet werden.

2. Einleitung

2.1. Speicheldrüse und Steroide

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß Corticosteron an verschiedenen Endorganen wie Niere und Leber der Ratte, Fischkiemen oder Harnblase der Kröte nicht nur eine Wirkung auslöst, sondern daß Corticosteron in den o.g. Organen auch metabolisiert wird (4,9,10, 11,18,19,20).

Auch die Speicheldrüse, ein Organ, in dem ein epithelialer Transport stattfindet, ist ein Endorgan für Corticosteroide. Die Arbeiten von Blair West et al.(2) und Young et al. (13) haben ergeben, daß Mineralcorticoide den Na/K-Quotienten in der Gl. submandibularis bei Schaf, Kaninchen und Ratte senken und daß bei den gleichen Tierspezies Glucocorticoide die Na-Konzentration im Speichel erniedrigen. Für Corticosteron konnten Bartholomei et al. nachweisen (1), daß die Na-K-ATP-ase-Aktivität in der Gl. submandibularis der Ratte durch dieses Hormon erhöht wird.

2.2. Fragestellung

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Frage untersucht, ob Corticosteron, das wichtigste endogene Sekretionsprodukt der Nebennierenrinde bei Ratten, im Speicheldrüsengewebe der Ratte unter in vitro Bedingungen metabolisiert wird.

Wir konnten nachweisen, daß Gewebe der Gl. submandibularis bei Inkubation mit Corticosteron in einer Konzentration von 10^{-6}molar das Hormon umwandelt, und zwar in einen weniger polaren Metaboliten. Zusätzlich entstehen in geringen Mengen zwei Metabolite, die

stärker polar sind als Corticosteron.
Bei dem apolaren Metaboliten handelt es sich um 11-dehydro-Corticosteron und bei den polaren um 11-dehydro-20ß-dihydro-Corticosteron und 20ß-dihydro-Corticosteron.

3. Versuchstiere und Methoden

3.1. Versuchstiere

Wir verwendeten männliche und weibliche, weiße Sprague Dawley Ratten, die zum Zeitpunkt der Operation 200-400g wogen. Die Tiere hatten freien Zugang zu Leitungswasser und bis zum Abend vor der Operation auch zu Futter (Altromin^{R}, Atroge Lippe) ad libitum.

3.2. Operationstechnik

Die Versuchstiere wurden entweder mit Pentobarbital (Nembutal^{R}, Ceva), 60 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal, narkotisiert oder mit einer Rattenguillotine dekapitiert. Nach einem medianen Halsschnitt und stumpfer Präparation der oberflächlichen Halsmuskulatur entfernten wir mit zwei Pinzetten die darunter liegenden Glandulae submandibulares. Diese sind paarig angelegt und reichen vom os hyoideum bis fast zum sternum. Die Glandulae submandibulares wurden sofort in eine eiskalte Krebs-Henseleit-Lösung gegeben. Anschließend wurden von anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe nach einem medianen Bauchschnitt die Leber und die Nieren, zur gleichzeitigen Untersuchung des Metabolismus von Corticosteron an diesen Organen, entnommen (4).

3.3. Aufbereitung des Gewebes

Auf einer eisgekühlten Petrischale entfernten wir zunächst die bindegewebige Kapsel der beiden Drüsen mit zwei Pinzetten und bestimmten dann ihr Gewicht. Die beiden Drüsen wogen je nach Größe des Tieres zwischen 500 und 900 mg. Das Drüsengewebe wurde mit einer Rasierklinge makroskopisch zerkleinert und dann an-

schließend zur Entfernung restlicher Blutbestandteile zweimal mit Krebs-Henseleit-Lösung gewaschen. Zur weiteren Aufbereitung inkubierten wir das Gewebe mit 15 mg/g Gewebe Kollagenase für 45 Minuten. Als Inkubationsmedium diente Krebs-Henseleit-Lösung in einem Verhältnis von dem Gewicht des Gewebes zum Volumen des Mediums von 1:10. Die Zusammensetzung des Mediums ist der Tab. 1 zu entnehmen. Die Inkubation erfolgte in einem Wärmebad bei 37°C unter ständiger Bewegung und Begasung mit einem O_2/CO_2-Gemisch (95%/5%). Zum Entfernen des Inkubationsmediums mit der Kollagenase wurde die Probe zweimal für je 1 Minute bei 1000 U/min zentrifugiert und der Überstand jeweils mit einer Spritze entfernt.

3.4. Inkubation mit Corticosteron

Das so aufbereitete Gewebe wurde 1:10 (Gewicht:Volumen) mit einem Corticosteron enthaltenden Inkubationsmedium inkubiert. Der Gesamtansatz betrug zwischen 5-9 ml, entsprechend des Gewebegewichtes.

Inkubationsmedium

Als Inkubationsmedium benutzten wir Krebs-Henseleit-Lösung, die als Energiesubstrat 10 µl Na-Laktat/ml KH enthielt. Als Hormon fügten wir 2-8 µCi Tritium-markiertes Corticosteron und 10^{-6} mol.l^{-1} nicht markiertes Corticosteron hinzu (s. Tab. 2 im Anhang).

Nach einer Inkubationsdauer von 1 min, 30 min und 60 min wurden dem Gesamtansatz mit einer Pipette jeweils 1,5 ml entnommen und analysiert. Nach Entnahme der einzelnen Proben aus dem Gesamtansatz wurde der

Rest des Ansatzes jeweils für 3 min mit einem O_2/CO_2-Gemisch (95%/5%) begast und für die weitere Dauer des Versuches in einem Wärmebad bei 37°C und unter ständiger Bewegung weiter inkubiert.

3.5. Analysen

3.5.1. Hormonnachweis

Die Bestimmung der Corticosteroide und der entstandenen Metabolite erfolgte nach einem von Schöneshöfer, Fenner und Dulce angegebenen Verfahren (17).

3.5.2. Biologisches Material

a) Analysiert wurden 1,5 ml Inkubationsmedium mit Speicheldrüsengewebe

b) Inkubationsmedium ohne Gewebe (Leerwert)

3.5.3. Extraktion der Corticosteroide (nach (17))

20 ml große Plastikspritzen (Omnifix^R, Braun) wurden mit 1,2 g einer mit Methanol (Merck) vorgereinigten, porösen Kieselgel-Matrix (Extrelut^R, Merck) beschickt und mit dem Spritzenstempel etwas angedrückt. Daraufhin wurde 1,5 ml biologisches Material und zusätzlich 0,5 ml einer exogenen Referenzhormonlösung (1 mg/l 18-OH-Corticosteron in wäßriger Lösung) langsam auf die Extrelutsäule aufgebracht. Nach 15 min wurde mit zweimal 5 ml Äther (Diäthyläther für die Spektrokopie, Merck) extrahiert und das Extrelut in konischen Glaszentrifugenröhrchen aufgefangen, die mit Dichlormethan (Merck) vorgereinigt waren. Nach etwa 10 Minuten waren die lipidlöslichen Bestandteile der Probe eluiert und unter leichtem Luftzug im warmen Wasserbad getrocknet.

Wurden die Extrakte nicht sofort chromatographiert, wurden sie nach Aufnahme in 100 µl Methanol bei -20°C für maximal 48 Stunden aufbewahrt.

3.5.4. Chromatographische Trennung

Für die Auftrennung der lipidlöslichen Bestandteile der Proben verwendeten wir die Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC). Zur Trennung des Hormons und seiner Metabolite bedienten wir uns in den ersten Pilotversuchen einer isokratischen Methode, gingen dann aber wegen einer ungenügenden Trennung von Corticosteron und 11-dehydro-Corticosteron auf die Gradiententechnik über.

Prinzip: Die stationäre Phase in der Trennsäule ist bei der normalen Phase polares Adsorptionsmittel z.B. beschichtetes Silicagel. Wir benutzten Trennsäulen (Knauer), die LiChrosorb Diol (Merck) enthielten. Die Auswahl der mobilen Phase, einem organischen Lösungsmittel, hängt von der Polarität der zu trennenden Komponenten ab. Je größer die Polarität der Komponenten ist, desto größer muß die Polarität der mobilen Phase sein. In den vorliegenden Versuchen verwendeten wir n-Hexan und Iso-Propanol. n-Hexan steht in der eluotropen Reihe links, d.h. es ist nur ganz gering polar und Iso-Propanol weit rechts davon, so daß durch eine optimale Mischung beider Lösungsmittel in der isokratischen und Gradiententechnik eine gute Trennung der Komponenten zu erreichen ist. Die Trennung kommt durch die Wechselwirkung von Adsorptionsmittel, Analysenprobe und Eluent zustande. Bei der Gradientenelution haben wir mit linearen Stufengradienten gear-

beitet. Die chromatographischen Trennverfahren und die benutzten Geräte und Parameter sind in der Tab. 3 und 4 aufgeführt. Bei dem HPLC-Gerät (Hewlett Packard) wurden die schon getrockneten biologischen Proben in 100 µl Hormoneichlösung aufgenommen und nach intensivem Rühren auf einem "Whirley-Mixer" (Cat. No. 34524 -200, Cenco) in das Gerät automatisch injiziert.

Zusammensetzung der Hormoneichlösung

Die Hormoneichlösung enthält 85% n-Hexan und 15% Iso-Propanol, denen die Steroide 20-ß-dihydro-Corticosteron, 11-dehydro, 20-ß-dihydro-Corticosteron und Corticosteron in einer Konzentration von 5 mg/l und 11-dehydro-Corticosteron in einer Konzentration von 10 mg/l als exogene Referenzhormone zugesetzt waren.

Am Beginn jeder Versuchsserie chromatographierten wir je eine Leerprobe, die nur die Eichlösung beinhaltete. Dies erfolgte zur Bestätigung der Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten von authentischen Referenzhormonen.

Die Retentionszeiten der Probenbestandteile wurden mit Hilfe des im Gerät eingebauten UV-Detectors bei 254 nm bestimmt (Abb. 2). Der Fraktionssammler (UltroRac^{R}7000, LKB) wurde vom Gerät automatisch angesteuert. Wir haben 1,0 Minuten-Fraktionen gesammelt.

3.5.5. Bestimmung der Radioaktivität

Die Position des markierten Corticosterons und seiner Metabolite wurde durch die Radioaktivität fraktioniert gesammelter Proben bestimmt. Diese wurden getrocknet und mit 4,6 ml "Liquid Scintillation cocktail" (Insta-Gel^{R}, Packard) aufgefüllt. Die anschließende Zählung erfolgte im Liquid Scintillation Spectrometer (Model

3385, Packard) mit automatischem externen Standard. Die Zähldauer pro Fraktion betrug jeweils 5 Minuten.

3.5.6. Technik der Datenauswertung

Die im "Liquid Scintillation Spectrometer" ermittelten Werte (cpm/Fraktion) wurden in einen Computer (PDP 11/34, DEC Maynard, USA) eingegeben, der sowohl Absolut-Radiogramme der einzelnen Proben, als auch Differenz-Radiogramme der Proben untereinander erstellte. Um auf dem Computer-Ausdruck die Verteilung der Tritium-Aktivität in den einzelnen Fraktionen der Probe vergleichen zu können, wurde die gesamte Tritium-Aktivität aller Fraktionen aus einer Probe gleich 100% gesetzt. Dann wurde die Tritium-Aktivität der einzelnen Fraktionen aus einer Probe als prozentuale Tritium-Aktivität der Probe gewertet.
Vorausgesetzt, die Änderung in der Verteilung der Radioaktivität ist durch die Verlagerung der Tritium-Aktivität von einer Fraktion zur anderen bedingt, so ist die prozentuale Tritium-Aktivität der Fraktionen der ersten Probe jedes Experimentes bei t_o von den Werten der korrespondierenden Fraktionen der folgenden Probe abzuziehen, mit dem Resultat eines Differenz-Radiogrammes. Ein solches Differenz-Radiogramm gibt die Änderung der Verteilung der Tritium-Aktivität der Proben in Abhängigkeit von der Zeit wieder. Ein positiver Wert zeigt das Entstehen einer neuen Substanz an, ein Nullwert bedeutet keine Änderung der Zusammensetzung, und ein negativer Wert entspricht der Abnahme einer vorher vorhandenen Substanz an dieser chromatographischen Position. Die Ergebnisse werden in % der totalen Tritium-Aktivität von jeder einzelnen Probe angegeben, d.h. als $\Delta\,[^3H]\,t_x - t_o$ in %.

4. Ergebnisse

Wir verwendeten in unseren Experimenten, wie in Tab. 5 detailliert dargestellt, männliche und weibliche Sprague Dawley Ratten und männliche Feldmäuse.

Proben des biologischen Materials (Inkubationsmedium und Gewebsschnitte) wurden zusammen mit exogenen Referenzhormonen an Extrelut adsorbiert und die lipidlöslichen Steroide mit Äther extrahiert. Die Proben wurden nach der HPLC-Gradientenmethode II (s. Tab. 4) aufgetrennt. Die Retentionszeiten der exogenen Referenzhormone wurden aus den Maxima der UV-Absorption im UV-Chromatogramm abgelesen. Die Analysenzeit bei diesem Verfahren betrug 60 Minuten. Das Eluat wurde in 35 1-minütigen Fraktionen gesammelt, da unsere Steroide und ihre Metabolite bei dieser Chromatographiemethode in der 19.-24. Minute bzw. Fraktion zu finden waren. Die Radioaktivität dieser Fraktionen wurde im Liquid Scintillation Spectrometer gemessen und in % der Gesamtaktivität angegeben.

Abb. 1 zeigt ein typisches Experiment. Auf der Ordinate ist die Tritium-Aktivität der Fraktionen als Differenz gegen den Aktivitätswert zum Zeitpunkt t_o in % der Gesamtaktivität aufgetragen. Die verschiedenen ^3H-Aktivitätsprofile der Proben, die nach 30 min und 60 min Versuchsdauer entnommen wurden, sind zeitlich versetzt abgebildet. Corticosteron zeigt bei dieser Elutionsmethode die chromatographische Position von 35 Minuten. Links von Corticosteron, d.h. auf der Seite geringerer Polarität, ist ein Aktivitätspeak, der die chromatographische Position von 32 Minuten aufweist und hier als Metabolit IV bezeichnet wird. Dieser Metabolit scheint das Hauptabbauprodukt von Corticosteron in der

Speicheldrüse in vitro zu sein. Sein prozentualer Anteil an der Gesamtaktivität aller Fraktionen einer Probe nach 60 min Inkubationszeit liegt bei 42,27%. Die Bezeichnung der Metaboliten stammt aus früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe an der isolierten Niere. Da es sich hier möglicherweise um die gleichen Metabolite handelt, haben wir die Bezeichnung beibehalten (s. Diskussion). In 15 von 32 Versuchen findet sich auf der Seite geringerer Polarität ein weiterer Aktivitätspeak, der die chromatographische Position von 22 Minuten aufweist und hier als Metabolit X' bezeichnet wird. Sein prozentualer Anteil an der Gesamtaktivität aller Fraktionen einer Probe nach 60 Minuten Inkubationszeit betrug im Durchschnitt 0,62%. Dieser in seiner Struktur noch nicht identifizierte Metabolit wurde von uns vorläufig nicht weiter untersucht. Rechts von Corticosteron sind zwei Aktivitätspeaks, die die chromatographische Position 44 und 49 min zeigen und als Metabolit I und II bezeichnet werden, wobei es sich möglicherweise um 11-dehydro-20-ß-dihydro-Corticosteron und 20-ß-dihydro-Corticosteron handelt (s. Diskussion). Sie sind polarer als Corticosteron. In allen Experimenten hat sich gezeigt, daß die Metabolite I und II nur in sehr geringer Menge in der Speicheldrüse gebildet werden. Der Anteil an der Gesamtaktivität aller Fraktionen einer Probe nach 60 Minuten Inkubationsdauer liegt für den Metabolit I bei 1,24% und für den Metabolit II bei 0,97% (s. Tab. 6 Versuch vom 31.8.83).

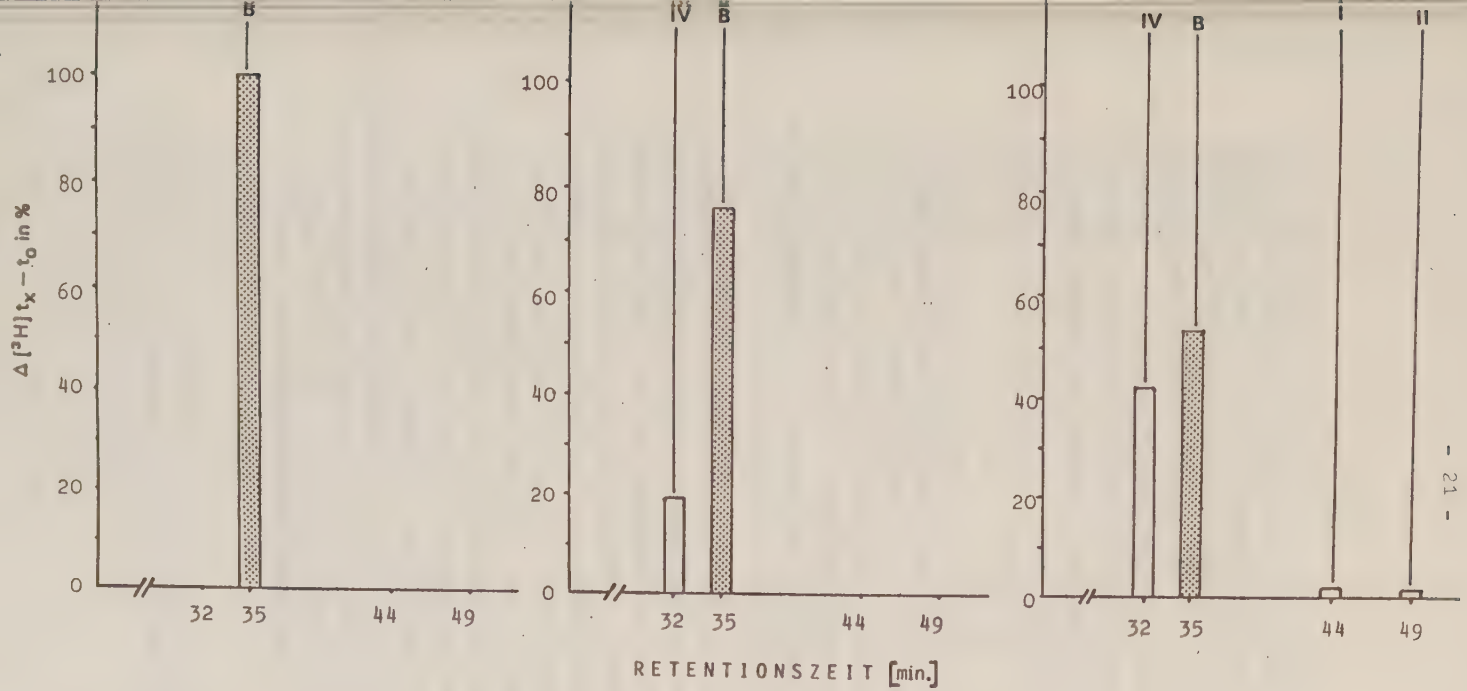

Abbildung 1: Ergebnisse eines typischen Experimentes. Versuch vom 31.8.83, männliche Ratte. Konzentration von B im Medium = 10^{-6} mol·l^{-1}

Abb. a) zu Beginn der Inkubation
Abb. b) nach 30 min Inkubationsdauer
Abb. c) nach 60 min Inkubationsdauer

I, II und IV sind die entsprechenden Metabolite

Die Abb. 2 zeigt ein typisches UV-Chromatogramm von vier exogenen, gereinigten Steroiden, nämlich 11-dehydro-B, Corticosteron, 11-dehydro-20ß-Dihydro-B und 20ß-dihydro-B. Die Retentionszeiten der Eichhormone sind aus den Maxima der UV-Absorption abgelesen. Da von vorangegangenen Chromatographien die Retentionszeiten dieser Referenzsteroide bekannt sind, ist eine Zuordnung der Peaks zu den einzelnen Steroiden möglich (s. Diskussion).

In Leerversuchen, d.h. in Versuchen ohne Speicheldrüsengewebe, bei denen unter gleichen Versuchsbedingungen 60 Minuten lang inkubiert wurde, fand sich keine Veränderung der Corticosteronaktivität und keine Bildung von Aktivitätspeaks, so daß eine unspezifische Zersetzung von Corticosteron im Inkubationsmedium in vitro ausgeschlossen werden kann.

Die Abb. 3 zeigt die Abnahme der Corticosteronkonzentration und die Zunahme der Konzentration von Metabolit IV in der Speicheldrüse von männlichen und weiblichen Tieren in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die folgenden Mittelwerte sind der Tab. 6 entnommen. Die Gesamtaktivität von Corticosteron hat von 100% zum Zeitpunkt t_o auf 41,5% bei männlichen Ratten und auf 34,8% bei weiblichen Ratten nach 60 Minuten Inkubationsdauer abgenommen. Im gleichen Zeitraum nahm der Metabolit IV von 0% zum Zeitpunkt t_o auf 51,27% bei männlichen Ratten und auf 61,88% bei weiblichen Ratten zu. Hieraus ergibt sich, daß sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Ratten fast das gesamte Corticosteron in den Metaboliten IV umgewandelt wird.

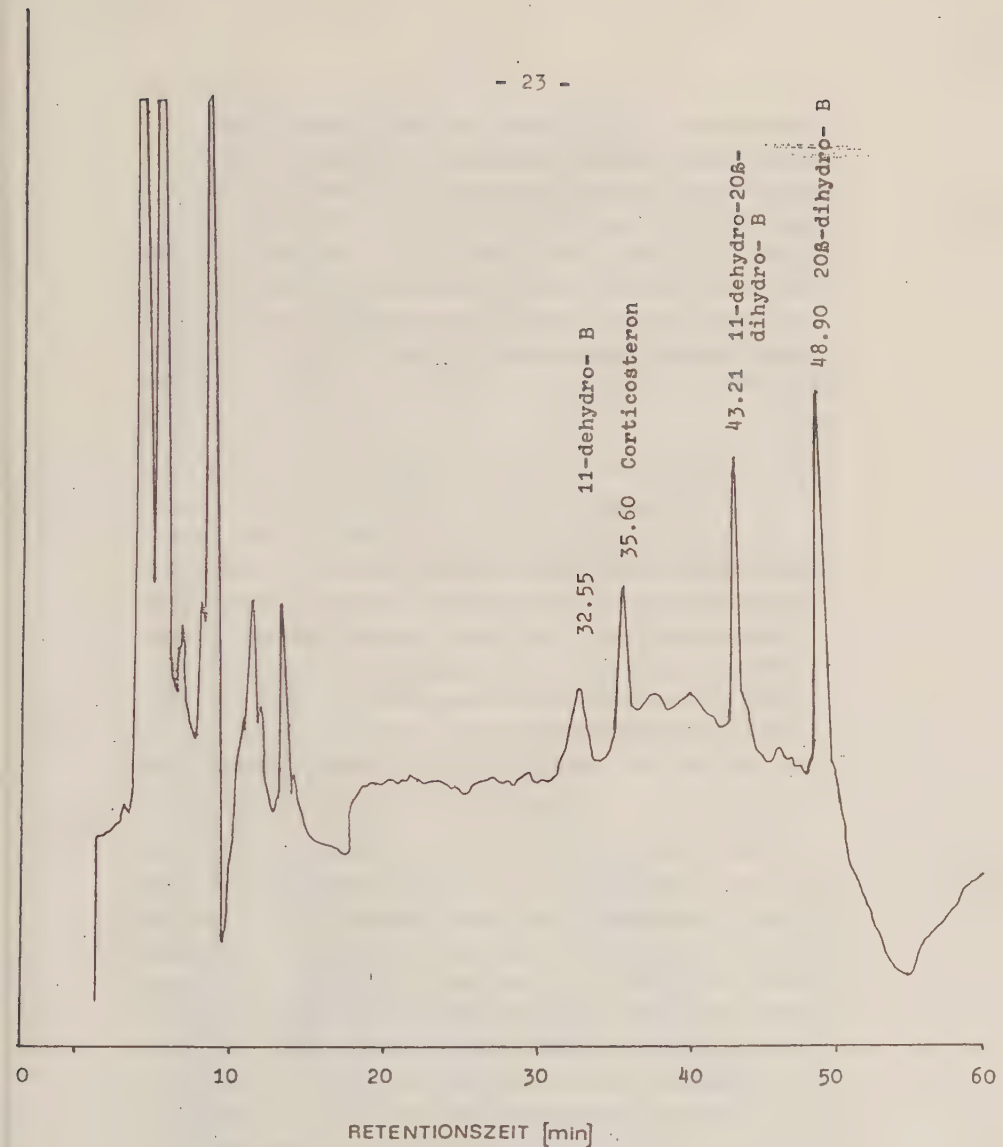

Abbildung 2: UV-Chromatogramm von 11-dehydro- B (10 mg/l), Corticosteron (5 mg/l), 11-dehydro-20ß-dihydro- B (5 mg/l) und 20ß-dihydro- B.
Gradienten Elution, Methode II (s. Tab. 4).

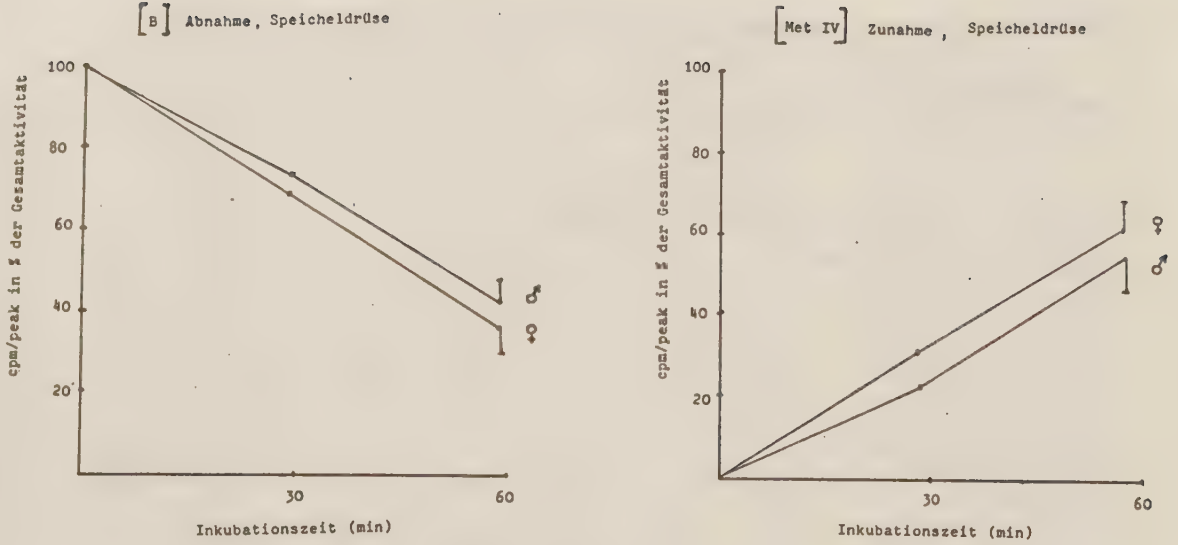

Abbildung 3: Vergleich des Metabolismus von Corticosteron und der Zunahme von Metabolit IV in Speicheldrüsen von männlichen und weiblichen Ratten. [ ] = Konzentration

Eine Versuchsserie mit weiblichen Ratten hat gezeigt, daß Speicheldrüsen von weiblichen Ratten den gleichen Metabolismus von Corticosteron aufweisen, wie die der männlichen Tiere. Es stellte sich eine etwas größere Schwankungsbreite der Einzelwerte um den Mittelwert dar, was u.U. auf zyklische Veränderungen bei weiblichen Tieren zurückgeführt werden könnte. Genauso wie bei den männlichen Ratten entsteht überwiegend der Metabolit IV und in geringen Mengen die Metabolite I und II (s. Tab. 6 IIa).

Nach der mechanischen Aufbereitung des Gewebes durch Hacken verblieben noch größere Gewebeteile. Um das Gewebe noch weiter aufzubereiten, verwendeten wir Kollagenase (15 mg/g Gewebe). Um eine eventuelle Wirkung der Kollagenase auf das Corticosteron-Metabolitmuster auszuschließen, haben wir eine Versuchsserie ohne Kollagenase durchgeführt. Der Umsatz von Corticosteron hat bei Versuchen mit Kollagenase im Vergleich zu den Versuchen ohne Kollagenase um 17,25% zugenommen. Die einzelnen Daten sind in der Tab. 6 Ib und Ic zusammengefaßt.

Bei einer weiteren Serie von Versuchen wurde dem Inkubationsmedium nach 30 Minuten Inkubationszeit 10^{-4} mol·l^{-1} Metyrapon (Metopiron^{R}) zugesetzt. Metyrapon ist chemisch 2-Methyl-1,2-dipyridyl (3)-1-oxopropan. Es hemmt die 11-ß- und 18-Hydroxylasefunktion (6,14,15). Bei früheren Versuchen an der isolierten Niere in unserer Arbeitsgruppe änderte sich bei Zugabe von Metyrapon das Metabolitmuster von Corticosteron (9,10,11). Es kam zu einer vermehrten Bildung von Metabolit I und zu einer Abnahme der Konzentration von Metabolit II. Bei Zusatz von Metyrapon zum Speicheldrüsengewebe während der Inkubation war

der Metabolismus von Corticosteron insgesamt niedriger, als bei den Versuchen ohne Metyrapon. Es ließ sich keine Zunahme von Metabolit I und Metabolit IV erzielen. Auch der Anteil von Metabolit I und Metabolit IV am Gesamtumsatz blieb unverändert. Der Metabolit II, der in den Experimenten ohne Metyrapon nach 30 min und 60 min in nur sehr geringer Konzentration vorhanden war, ließ sich mit Metyrapon nicht mehr nachweisen. Die Ergebnisse sind in der Tab. 6 Id zusammengefaßt.

Bei zwei Versuchsserien wurden die Tiere an drei dem Versuchstag vorangehenden Tagen mit 50 mg/kg Phenobarbital (Nembutal^{R}) zum Zweck der Enzyminduktion vorbehandelt. Die Injektion erfolgte, nach dem Rezept von Dr. Roots*, intraperitoneal am 1. Tag morgens und abends und an den anderen beiden Tagen nur abends. Der Corticosteronmetabolismus in der Speicheldrüse ließ sich durch Phenobarbital nicht anregen. Die Ergebnisse weichen nicht von der unbehandelten Kontrollgruppe ab (s. Tab. 6, Versuche vom 7.9.83 und 12.9.83). Im Gegensatz zum Metabolismus in der Speicheldrüse kam es in gleichzeitig untersuchten Leberschnitten derselben Tiere zu einer Zunahme der Metabolisierungsrate von Corticosteron, angeregt durch Phenobarbital.

In drei Pilotversuchen, die wir mit Speicheldrüsen von männlichen grauen Feldmäusen durchgeführt haben, konnten wir einen insgesamt niedrigeren Metabolismus von Corticosteron im Vergleich zu den Speicheldrüsen der Ratten feststellen. Das Hauptmetabolisierungsprodukt war auch hier der Metabolit IV. Die Metabolite I und II waren hier nicht zu finden (s. Tab. 6 III).

---

* Herrn Priv.Doz. Dr. Ivar Roots danke ich für den Dosierungsvorschlag.

In unserer Arbeitsgruppe wurden in fast allen durchgeführten Experimenten neben den Speicheldrüsen bei demselben Tier gleichzeitig Leber- und Nierenschnitte mit derselben Methode untersucht (s. Tab. 5). Die Abb. 4 zeigt den Vergleich des Metabolismus von Corticosteron bei männlichen Ratten in Gewebsschnitten von Speicheldrüsen, Leber und Niere. Dargestellt ist die Abnahme der Konzentration von Corticosteron und die Zunahme von Metabolit IV. Sowohl die prozentuale Abnahme von Corticosteron als auch die prozentuale Zunahme von Metabolit IV war in der Speicheldrüse, bezogen auf Gramm Feuchtgewicht, am größten.

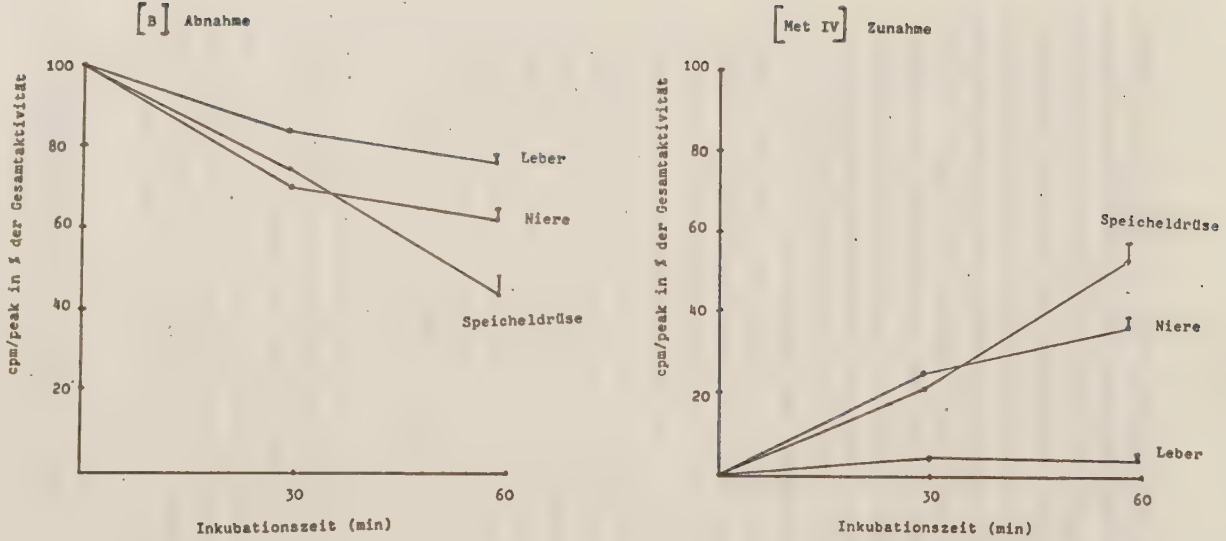

Abbildung 4: Vergleich des Metabolismus von Corticosteron und der Zunahme von Metabolit IV in Gewebsschnitten männlicher Ratten. [ ] = Konzentration

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns die Aufgabe gestellt, den Corticosteronmetabolismus in der Speicheldrüse zu untersuchen. Es hat sich gezeigt, daß Corticosteron, welches bei der Ratte das Hauptsekretionsprodukt der Nebennierenrinde ist (3), vom Speicheldrüsengewebe hauptsächlich in den Metaboliten IV und in geringen Mengen auch in die Metabolite I und II umgewandelt wird.

Daß die Speicheldrüsen ein Erfolgsorgan für Corticosteroide darstellen, haben die Arbeiten von Blair-West et al. (2) und Young et al. (13) gezeigt. Die Untersuchungen von Blair-West et al. haben ergeben, daß Aldosteron entsprechend seiner mineralocorticoiden Wirkung den Na/K-Quotienten im Speichel von Schafen senkt. Glucocorticoide (Cortisol, Corticosteron) hatten nur in sehr hohen Dosen diesen mineralocorticoiden Effekt. Auch Young et al. konnte mit Aldosteron und DOCA den Na/K-Quotienten im Speichel von verschiedenen Tierspezies senken. Dies gelang ihm auch mit Dexamethason in hohen Dosen.
Bartholomei et al. (1) untersuchten den Einfluß von Corticosteron auf die Na/K-ATP-ase-Aktivität in der Gl. submandibularis der Ratte. Es stellte sich heraus, daß Corticosteron die Aktivität dieses Enzyms erhöht. Eine glucocorticoide Wirkung von Steroidhormonen auf die Speicheldrüse ist uns aus der Literatur nicht bekannt.

Es war nun für uns von Interesse, ob die Speicheldrüse, die somit ein Erfolgsorgan für Corticosteroide darstellt, zum Metabolismus von Corticosteron befähigt ist.

Zum Nachweis des Metabolismus von Corticosteron in der Gl. submandibularis der Ratte in vitro inkubierten wir Speicheldrüsenschnitte von männlichen und weiblichen Tieren mit Corticosteron. Das Prinzip der Inkubation wurde bereits 1972 von Guder und Wieland (8) anhand von isolierten Nierentubuli beschrieben. Mit der gleichen Methode, die wir bei den Speicheldrüsenschnitten verwandten, wurde in unserer Arbeitsgruppe der Corticosteronmetabolismus in der Niere und Leber untersucht. Für die Auftrennung der lipidlöslichen Bestandteile der Proben verwendeten wir die Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC). Durch die von uns verwendeten Elutionsmethoden konnte eine gute Trennung der Referenzhormone und der Metabolite erreicht werden (s. Abb. 2 und detaillierte Beschreibung der Methode bei 3.3.-3.5.).

Bei unseren Versuchen ließen sich drei Metabolite nachweisen, die wir als Metabolit I, II und IV bezeichneten. Der Metabolit IV befand sich, ausgehend von Corticosteron, auf der Seite geringerer Polarität und die Metabolite I und II auf der Seite stärkerer Polarität. In Relation zum Gesamtumsatz entstand hauptsächlich der Metabolit IV. Die Metabolite I und II waren jeweils nur in geringer Menge nachweisbar (s. Tab. 6). Mit zunehmender Inkubationsdauer kam es unter Abnahme von Corticosteron zu einem Anstieg der oben genannten Metabolite proportional der Zeit. Daß es sich hierbei um Metabolite von Corticosteron handelt, zeigten parallel durchgeführte Leerversuche, bei denen wir das Medium ohne Speicheldrüsengewebe inkubierten. In diesen Leerversuchen kam es zu keinem Metabolismus von Corticosteron.

In früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe an der isolierten Niere und an Nierenschnitten fanden sich Meta-

bolite (10,11,18), deren chromatographische Positionen denen der in der Speicheldrüse gefundenen entsprachen. Es stellte sich dann die Frage, ob es sich hier auch tatsächlich um die gleichen Metabolite handelte.

Die massenspektrometrische Strukturanalyse der in der Niere gefundenen Metabolite hatte folgendes ergeben: Der Metabolit I ist identisch mit 11-dehydro-20-ß-dihydro-Corticosteron. Der Metabolit II entspricht 20-ß-dihydro-Corticosteron und der Metabolit IV 11-dehydro-Corticosteron. Diese Substanzen sind bei der Chromatographie der Speicheldrüsenproben verwendet worden. Ihre chromatographischen Positionen sind bekannt und in der Abb. 2 dargestellt. Da die Retentionszeiten des in den Versuchen verwendeten Corticosterons in den Proben einer Serie gleich waren, konnten die Differenz-Radiogramme von Proben, die nach 1 min, 30 min und 60 min Inkubationszeit gewonnen wurden, durch Substraktion der Anfangswerte gebildet werden. Die Positionen der entstandenen Metabolite und des Corticosterons entsprachen denen der Referenzhormone, zuzüglich cá. 0,7 min Verzögerungszeit. Die Verzögerungszeit resultiert aus der Fließgeschwindigkeit und der Entfernungen vom UV-Detektor zum Fraktionssammler. Die Übereinstimmung der einzelnen chromatographischen Positionen wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Verfahren (isokratische- und Gradientenmethode) festgestellt. Die mittleren Retentionszeiten der Referenzhormone betrugen bei der verwandten chromatographischen Methode für den Met IV 32,43 min, B 35,71 min, Met I 43,39 min, Met II 49,03 min. Die von uns gefundenen Metabolite befanden sich im Mittel in folgenden Fraktionen: Met IV in der 15. Fraktion, B in der 18. Fraktion, Met I in der 25. Fraktion und der Met II in der 30. Fraktion.

Bei dieser chromatographischen Methode entspricht die 15. Fraktion der chromatographischen Position der 32.-33. Minute. Die 18. Fraktion entspricht der 35. -36. Minute, die 25. Fraktion der 42.-43. Minute und die 30. Fraktion der 47.-48. Minute (s. detaillierte Beschreibung der Methode). Vergleicht man die Retentionszeiten der Referenzhormone mit denen der entstandenen Metabolite, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

Neben männlichen verwendeten wir auch weibliche Versuchstiere, um einen eventuellen Geschlechtsunterschied beim Metabolismus von Corticosteron festzustellen. Das Metabolitmuster der weiblichen Ratten entsprach jedoch dem der männlichen Tiere. Genauso wie bei den männlichen Ratten entstand überwiegend der Metabolit IV und in geringen Mengen die Metabolite I und II (s. Tab. 6). Dieser Befund unterscheidet sich von den Ergebnissen bei Leber- und Nierenschnitten. Der renale Stoffwechsel von Corticosteron war dort geschlechtsabhängig. Nierengewebe von weiblichen Ratten bildete aus Corticosteron vorwiegend die weniger polaren Metabolite III und IV (9,10,18). Der Metabolit III konnte in der Speicheldrüse nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu bildeten die Nieren männlicher Ratten überwiegend die stärker polaren Metabolite I und II und den Metaboliten III.

Zur besseren Aufbereitung des Speicheldrüsengewebes verwendeten wir Kollagenase. Um den Einfluß von Kollagenase auf den Corticosteronmetabolismus zu überprüfen, haben wir eine Versuchsserie ohne Kollagenase durchgeführt. Durch die Kollagenase kam es zu einer Zunahme des Gesamtmetabolismus um 17,25%. Dies läßt sich möglicherweise durch eine bessere Homogenisierung des Ge-

webes erklären. Hierbei werden die Diffusionsstrecken verkürzt, und das Hormon gelangt leichter in die Zelle.

Bei einer Reihe von Versuchen wurde dem Inkubationsmedium nach 30 min Inkubationszeit 10^{-4} mol·l^{-1} Metyrapon (Metopiron^{R}) zugesetzt. Metyrapon hemmt die 11-ß- und 18-Hydroxylasefunktion und stimuliert die Reduktion an C 20 und möglicherweise die Dehydratation an C 11 (6,14,15). Bei früheren Versuchen an der isolierten Niere in unserer Arbeitsgruppe änderte sich bei Zugabe von Metyrapon das Metabolitmuster von Corticosteron (9,10,11). Es kam zu einer vermehrten Bildung von Metabolit I und zu einer Abnahme der Konzentration von Metabolit II. Bei Zusatz von Metyrapon zum Speicheldrüsengewebe während der Inkubation war die Metabolisierungsrate von Corticosteron insgesamt niedriger, als bei den Versuchen ohne Metyrapon. Es ließ sich keine Zunahme von Metabolit I und Metabolit IV erzielen. Auch der Anteil von Metabolit I und Metabolit IV am Gesamtansatz blieb unverändert. Der Metabolit II, der in den Experimenten ohne Metyrapon nach 30 min und 60 min in nur sehr geringer Konzentration vorhanden war, ließ sich bei Zugabe von Metyrapon nicht mehr nachweisen.

In unserem Labor wurde zur gleichen Zeit der Metabolismus von Corticosteron an Leberschnitten von männlichen Feldmäusen untersucht. Dies gab uns die Möglichkeit, auch hier die Speicheldrüsen zu entnehmen und darzustellen, inwieweit sich die Ergebnisse der Rattenversuche auf eine andere Tierart übertragen lassen. In den drei durchgeführten Pilotversuchen wurde Corticosteron ebenfalls metabolisiert. Auch hier war der Metabolit IV mengenmäßig das Hauptabbauprodukt. Eine sichere Aussage über die anderen Meta-

bolite läßt sich aus den Pilotversuchen nicht machen.

Aus den Versuchen an den Speicheldrüsen der Ratte, die uns gezeigt haben, daß aus Corticosteron 11-dehydro-Corticosteron, 11-dehydro-20-ß-dihydro-Corticosteron entstehen, läßt sich ableiten, daß in der Speicheldrüse der Ratte folgende Fermente vorhanden sein müssen:

a) 20-ß Hydroxysteroid Oxidoreduktase (EC 1.1.1.53)
b) 11-ß Hydroxysteroid Dehydrogenase (EC 1.1.1.146).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben uns die Feststellung, daß Corticosteron in der Speicheldrüse der Ratte in vitro metabolisiert wird. Da in der Mehrzahl der Versuche gleichzeitig mit der Speicheldrüse die Leber und die Nieren auf den Metabolismus von Corticosteron mit der gleichen Methode untersucht wurden (4), läßt sich vergleichend aussagen, daß

a) die Umwandlung von Corticosteron in lipidlösliche Metabolite in der Speicheldrüse insgesamt höher ist als in Leber- und Nierenschnitten

b) daß in der Speicheldrüse und in der Niere der Metabolit IV das Hauptabbauprodukt ist und in der Leber der Metabolit I

c) in der Speicheldrüse wesentlich weniger Metabolit II gebildet wird als in der Leber oder Niere

d) die Bildungsrate von Metabolit I in der Speicheldrüse der in der Niere entspricht, aber gringer ist als in der Leber

e) in der Leber und Niere noch, zusätzlich zu den in der Speicheldrüse gefundenen Metabolite, andere lipidlösliche Metabolite und außerdem noch wasserlösliche Metabolite gefunden wurden.

Wie verschiedene Autoren bereits gezeigt haben, ist die Speicheldrüse ein Targetorgan für Mineralcorticoide. Eine glucocorticoide Wirkung von Corticosteron auf die Speicheldrüse ist bisher in der Literatur unseres Wissens nach nicht beschrieben.

Nachdem wir zeigen konnten, daß die Speicheldrüse Corticosteron metabolisiert, stellt sich nun die Frage der physiologischen Bedeutung dieses Ergebbnisses. Einerseits wäre es möglich, daß durch das Speicheldrüsengewebe Corticosteron in eine inaktive Form überführt wird. Dadurch könnte die glucocorticoide Wirkung des Hormons auf das Organ verhindert werden. Andererseits könnte man die Frage diskutieren, ob das in der Speicheldrüse aus Corticosteron hauptsächlich entstehende 11-dehydro-Corticosteron eine biologisch aktive Form des Hormons darstellt und in der Speicheldrüse einen Effekt auslöst. Bis heute ist jedoch keine starke glucocorticoide Wirkung von 11-dehydro-Corticosteron bekannt. Dieser Punkt bedarf weiterer Analysen.

Funder et al. konnte zeigen, daß Aldosteron im Cytosol und im Kern von Nieren- und Speicheldrüsenschnitten an spezifische Proteine gebunden wird (7). Es wäre daher interessant herauszufinden, ob Aldosteron mit seiner bekannten mineralocorticoiden Wirkung auf die Zusammensetzung des Speichels vom Speicheldrüsengewebe metabolisiert wird. Sollte Speicheldrüsengewebe Aldosteron nicht metabolisieren, könnte das ein Hinweis dafür sein, daß der Metabolismus von Corticosteron eine Inaktivierung des Hormons bewirkt.

6. Tabellarischer Anhang

Tab. 1 a) Zusammensetzung der Krebs Henseleit-Lösung

Na^+	142	$mmol \cdot l^{-1}$	Merck
K^+	5,88	"	
Ca^{2+}	2,5	"	
Mg^{2+}	1,19	"	
Cl^-	128,0	"	
PO_4^{2-}	1,18	"	
SO_4^{2-}	1,19	"	
HCO_3^-	24,9	"	

b) Herstellung der Krebs-Henseleit-Lösung

0,9 %	NaCl-Lösung	(0,154 m)	- 100 Teile
1,15 %	KCl-Lösung	(0,154 m)	- 4 "
	CaCl-Lösung	(0,11 m)	- 3 "
2,11 %	KH_2PO_4-Lösung	(0,154 m)	- 1 Teil
3,82 %	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$-Lösung	(0,154 m)	- 1 "
1,3 %	$NaHCO_3$-Lösung	(0,154 m)	- 21 Teile

Gasgemisch mit 5 Vol% CO_2 plus 95 Vol% O_2 1 Stunde durchgasen.

Tab. 2 Zusammensetzung des Inkubationsmediums

K-H-Lösung	Na-Laktat	Hormon nicht markiert	Hormon markiert
Zusammensetzung siehe Tab. 1	Na-Laktat 11,2 % - Lösung (Braun Melsungen AG) Verhältnis Na-Laktat/K-H-Lsg. 1:100 (Gewicht/Volumen)	Corticosteron (MG 346,5) 10^{-6} mol·l^{-1} (Sigma)	(1,2,6,7-^{3}H(N))-Corticosteron (Spez. Aktivität: ~105 Ci $mmol^{-1}$) MG 346,5 2-8 mCi·l^{-1} (New England Nuclear)

Tab. 3 Komponenten und Betriebsparameter des HPLC-Systems

Gerät	Funktion	Ausstattung	Betriebsparameter
Serie 2, Perkin Elmer bzw. Serie 3b, Perkin Elmer	Pumpeneinheit	programmierbar 2 getrennt einstellbare Pumpen mit 2 Lösungsmittelreservoirs	Fluß: 1,3 ml/min. Druck: 4,2 - 5,0 MPa Pumpe A: 75% n-Hexan/ 25% Iso-Propanol Pumpe B: n-Hexan Gradientenelution (siehe Tab. 4)
LC-75, Perkin Elmer	Spektrophotometer-Detektor	Variable Wellenlänge Scan-Einrichtung	Wellenlänge: 254 nm
ISS-100, Perkin Elmer	Injektor	programmierbar, automatische Injektion möglich Variables Injektionsvolumen	Injiziert Probe:(70 µl), startet Pumpen und Datengerät

Tab. 3 - Fortsetzung -

Gerät	Funktion	Ausstattung	Betriebsparameter
Sigma 1, Perkin Elmer	Datengerät mit Plot-Print-Terminal	programmierbar, Ausdruck der Retentionszeiten, Peak-Flächenberechnung	Steuerung des Gesamtablaufs
LiChrosorb Diol 5 µm, Knaur-Merck	Trennsäule	Innendurchmesser: 4,6 mm Länge: 25 cm Korngröße: 5 um	Temperatur: 30°C
2070 Ultrorac II, LKB bzw. 2211 Superrac, LKB	Fraktionssammler	programmierbar	Verzögerungszeit zum UV-Detektor: 0,7 sec 0,5'-1,0' -Fraktionen Durch Impulse vom Datengerät gesteuert.

Tab. 4 Übersicht über die verschiedenen chromatographischen Verfahren

Chromat. Verfahren	Stationäre Phase	Mobile Phase	Bedingungen
Isokratische Methode	Diol (Merck)	Lösung A:	a) 60 % Lsg. A
	Korngröße: 5 µm	75 % n-Hexan/	b) 85 % Lsg. A
	in Trennsäule (Knauer)	25 % Iso-Propanol	
Experiment 1-5	I.D.: 4,6 mm	Lösung B:	
	Länge: 25 cm	n-Hexan[1)]	
Gradienten-methode I	wie oben	wie oben	Gradient (linear)
			0 - 27 min 27 % Lsg. A
			27 -41,5 min- 85 % Lsg. A
Experiment 6-12			41,5 - 45 min 85 % Lsg. A
			45 - 60 min 27 % Lsg. A

1) n-Hexan, Iso-Propanol und Methanol (Merck) "für die Spektroskopie"; (n-Hexan und Iso-Propanol enthielten 0,005 % Triäthylamin (Merck).

Tab. 4 - Fortsetzung -

Chromat. Verfahren	Stationäre Phase	Mobile Phase	Bedingungen
Gradienten-methode II Experiment 13-43	wie oben	wie oben	Gradient (linear) 0 - 27 min 27 % Lsg. A 27 - 45 min- 85 % Lsg. A 45 - 60 min 27 % Lsg. A

Tab. 5 Übersicht über die verwendeten Tiere

Lfd. Nr.	Datum	Gewicht (g)	Geschlecht	$[B]$ $mol \cdot l^{-1}$	untersuchte Gewebe Gl. sub.	Niere	Leber	Sub. Fr.	Inkubationsdauer (min)	Versuchsserie s. Tab. 6
S.D. - RATTEN										
1	3.11.82	305	♂	10^{-9}	+	+			120	p
2	1.12.82	340	♂	10^{-9}	+	+			120	p
3	8.12.82	347	♂	10^{-9}	+	+			120	p
4	22.12.82	380	♂	10^{-9}	+	+			120	p
5	12. 1.83	271	♂	10^{-9}	+				120	p
6	16. 2.83	381	♂	10^{-9}	+				120	p
7	18. 2.83	415	♂	10^{-9}	+				120	p
8	22. 3.83	369	♂	10^{-6}	+	+			60	Ic
9	5. 4.83	350	♂	10^{-6}	+	+			60	Ic
10	5. 5.83	266	♂	10^{-6}	+	+			60	Ic
11	12. 7.83	230	♀	10^{-6}	+	+	+		60	IIa
12	12. 7.83	226	♀	10^{-6}	+	+	+		60	IIc
13	20. 7.83	233	♀	10^{-6}	+	+	+		60	IIa

Tab. 5 - Fortsetzung - 1

Lfd. Nr.	Datum	Gewicht (g)	Geschlecht	[B] $mol \cdot l^{-1}$	untersuchte Gewebe Gl. sub.	Niere	Leber	Sub. Fr.	Inkubationsdauer (min)	Versuchsserie s. Tab. 6
14	20. 7.83	293	♂	10^{-6}	+	+	+		60	Ic
15	2. 8.83	322	♂	10^{-6}	+	+	+		60	O
16	2. 8.83	236	♀	10^{-6}	+	+	+		60	O
17	19. 8.83	370	♂	10^{-6}	+	+	+		60	Ic
18	19. 8.83	243	♀	10^{-6}	+	+	+		60	IIa
19	31. 8.83	330	♂	10^{-6}	+	+	+		60	Ic
20	31. 8.83	268	♀	10^{-6}	+	+	+		60	IIa
21	7. 9.83	339	♂	10^{-6}	+	+	+		60	Ie
22	7. 9.83	330	♂	10^{-6}	+	+	+		60	Ic
23	12. 9.83	245	♀	10^{-6}	+	+	+		60	IIb
24	12. 9.83	248	♀	10^{-6}	+	+	+		60	IIa
25	19. 9.83	370	♂	10^{-6}	+	+		+	60	Ib

Tab. 5 - Fortsetzung - 2

Lfd. Nr.	Datum	Gewicht (g)	Geschlecht	$[B]$ $mol \cdot l^{-1}$	untersuchte Gewebe Gl. sub.	Niere	Leber	Sub. Fr.	Inkubations-dauer (min)	Versuchs-serie s. Tab. 6
26	19. 9.83	360	♂	10^{-6}	+	+		+	60	Id
27	22. 9.83	355	♂	10^{-5}	+	+		+	60	If
28	22. 9.83	365	♂	10^{-5}	+	+		+	60	Ig
29	26. 9.83	360	♂	10^{-6}	+	+		+	60	Ib
30	26. 9.83	385	♂	10^{-6}	+	+		+	60	Id
31	3.10.83	350	♂	10^{-9}	+				60	Ia
32	3.10.83	350	♂	10^{-9}	+				60	Ia
33	6.10.83	360	♂	10^{-9}	+				60	Ia
34	6.1083	360	♂	10^{-9}	+				60	Ia
35	10.10.83	380	♂	10^{-6}	+				60	Id
36	10.10.83	400	♂	10^{-6}	+				60	Id
37	11.10.83	385	♂	10^{-6}	+	+		+	60	Ib
38	11.10.83	395	♂	10^{-6}	+	+		+	60	Ib

Tab. 5 - Fortsetzung - 3

Lfd. Nr.	Datum	Gewicht (g)	Geschlecht	$[B]$ $mol \cdot l^{-1}$	untersuchte Gewebe Gl. sub.	Niere	Leber	Sub. Fr.	Inkubations-dauer (min)	Versuchs-serie s. Tab. 6
MÄUSE										
39	24.10.83	24	♂	10^{-6}	+	+	+		60	III
40	24.10.83	28	♂	10^{-6}	+	+	+		60	III
41	14. 9.83	34	♂	10^{-6}	+	+	+		60	III

Erklärung von Abkürzungen:

Gl. sub. - Glandula submandibularis

Sub. Fr. - Subzelluläre Fraktion (Niere)

p - Pilotversuche

0 - Versuche nicht verwertbar, da technischer Fehler bei HPLC

Tab. 6: Prozentuale Abnahme der B-Konzentration und prozentuale Zunahme der Metabolitkonzentration im Speicheldrüsengewebe in vitro

Ia: Kontrollratten, ♂ , $[B] = 10^{-9} mol \cdot l^{-1}$

Vers. Datum	[B] (%) 30'	60'	[Met I] (%) 30'	60'	[Met II] (%) 30'	60'	[Met IV] (%) 30'	60'	[Met x'] (%) 30'	60'	Abnahme von [B] (%) 60'	Zunahme von [Metaboliten] (%) 60'
3.10.83	39,38		1,70		0,38		53,98		1,36		60,62	57,42
6.10.83	49,64		2,07		0,61		42,18		1,15		50,36	46,01
6.10.83	40,72		1,47		0,35		53,36		0,87		59,28	56,05
3.10.83	34,86		0,78		0,19		62,92		0,64		65,13	64,53
$\bar{x}$	40,90		1,51		0,38		53,11		1,00		58,85	56,00
SE	±2,87		±0,27		±0,09		±4,25		±0,16		±3,09	±3,81

- = Im Differenz-Radiogramm nicht nachweisbar

Diese Pilot-Versuchsserie enthält nur die 60-Minuten-Werte.

Tab. 6: - 1. Fortsetzung -

Ib: Kontrollratten, ♂, [B] = 10^{-6} mol·l^{-1}, ohne Kollagenase

Vers. Datum	[B] (%) 30'	60'	[Met I] (%) 30'	60'	[Met II] (%) 30'	60'	[Met IV] (%) 30'	60'	[Met x'] (%) 30'	60'	Abnahme von [B] (%) 60'	Zunahme von [Metaboliten] (%) 60'
19. 9.83	71,51	61,34	0,38	0,93	-	-	25,54	33,49	0,72	1,55	38,66	35,97
26. 9.83	93,54	72,83	0,24	1,17	-	-	6,34	21,83	-	0,88	27,17	23,88
11.10.83	81,86	56,15	0,55	0,92	-	0,68	21,86	35,23	0,52	0,98	43,85	37,81
11.10.83	74,08	44,65	0,77	1,08	-	-	20,55	39,08	-	0,84	55,35	41,00
$\bar{x}$	80,25	58,74	0,49	1,03			18,57	32,41	0,62	1,06	41,25	34,67
SE	±4,95	±5,85	±0,11	±0,06			±4,21	±3,71	±0,10	±0,17	±5,85	±3,74

- Im Differenz-Radiogramm nicht nachweisbar

Tab. 6: - 2. Fortsetzung -

Ic: Kontrollratten, ♂, [B] = 10^{-6} mol·l^{-1}

Vers. Datum	[B] (%) 30'	60'	[Met I] (%) 30'	60'	[Met II] (%) 30'	60'	[Met IV] (%) 30'	60'	[Met x'] (%) 30'	60'	Abnahme von [B] (%) 60'	Zunahme von [Metaboliten] (%) 60'
22.5.83	75,70	66,13	-	-	-	-	22,44	30,92	-	-	33,87	30,92
5.4.83	75,66	36,65	0,57	3,38	-	-	20,19	46,46	-	-	63,35	49,84
5.5.83	82,38	58,48	3,04	3,20	-	0,26	11,98	32,52	-	-	41,52	35,98
20.7.83	68,98	24,20	0,37	0,96	-	0,22	30,23	74,28	-	0,37	75,80	75,46
9.8.83	81,61	19,18	0,36	1,93	0,13	1,66	17,10	70,35	-	0,76	80,82	73,94
31.8.83	75,82	52,95	-	1,24	-	0,97	19,10	42,27	-	-	47,05	44,48
7.9.83	83,00	32,88	0,50	1,57	0,17	0,19	13,86	62,09	0,16	0,73	67,12	63,85
$\bar{x}$	77,59	41,50	0,97	2,05	0,15	0,66	19,27	51,27		0,62	58,50	53,49
SE	±1,90	±6,76	±0,51	±0,42	±0,02	±0,29	±2,28	±6,70		±0,13	±6,76	±6,75

- Im Differenz-Radiogramm nicht nachweisbar

Tab. 6: - 3. Fortsetzung -

Id: Kontrollratten, ♂ , [B] = 10^{-6} mol·l^{-1}, [Metopiron] = 10^{-4} mol l^{-1}

Vers. Datum	[B] (%) 30'	60'	[Met I] (%) 30'	60'	[Met II] (%) 30'	60'	[Met IV] (%) 30'	60'	[Met x'] (%) 30'	60'	Abnahme von [B] (%) 60'	Zunahme von [Metaboliten] (%) 60'
19. 9.83	95,12	81,32	-	0,48	-	-	4,34	15,14	-	-	18,68	15,62
26. 9.83	88,97	62,04	0,73	2,04	-	-	7,09	30,23	-	-	37,96	32,27
10.10.83	76,47	55,33	0,45	1,31	-	-	15,65	39,54	0,36	1,11	44,67	41,96
10.10.83	82,67	57,70	0,66	2,69	0,39	0,31	12,41	32,60	0,52	2,90	42,30	38,50
$\bar{x}$	85,81	64,09	0,61	1,61			9,87	29,40	0,44	2,00	35,90	32,08
SE	±4,03	±5,91	±0,08	±0,50			±2,55	±5,14	±0,08	±0,90	±5,90	±5,84

- Im Differenz-Radiogramm nicht nachweisbar

Tab. 6: - 4. Fortsetzung -

Vers. Datum	[B] (%) 30'	[B] (%) 60'	[Met I] (%) 30'	[Met I] (%) 60'	[Met II] (%) 30'	[Met II] (%) 60'	[Met IV] (%) 30'	[Met IV] (%) 60'	[Met x'] (%) 30'	[Met x'] (%) 60'	Abnahme von [B] (%) 60'	Zunahme von [Metaboliten] (%) 60'
	Ie: Kontrollratten, ♂, nach 3-tägiger Enzyminduktion mit 50 mg/kg Phenobarbital, [B] = 10^{-6} mol·l^{-1}											
7.9.83	84,84	47,91	0,43	1,02	0,19	-	12,53	51,31	-	-	52,08	52,33
	If: Kontrollratten, ♂, [B] = 10^{-5} mol·l^{-1}, ohne Kollagenase											
22.9.83	92,35	89,70	1,07	1,05	-	-	-	3,26	-	-	10,30	4,31
	Ig: Kontrollratten, ♂, [B] = 10^{-5} mol·l^{-1}, [Metopiron] = 10^{-4} mol·l^{-1}											
22.9.83	96,09	95,12	-	-	-	-	-	0,77	-	-	4,88	0,77

- Im Differenz-Radiogramm nicht nachweisbar

Tab. 6: - 5. Fortsetzung -

IIa: Kontrollratten, ♀ , [B] = 10^{-6} mol·l^{-1}

Vers. Datum	[B] (%) 30'	60'	[Met I] (%) 30'	60'	[Met II] (%) 30'	60'	[Met IV] (%) 30'	60'	[Met x'] (%) 30'	60'	Abnahme von [B] (%) 60'	Zunahme von [Metaboliten] (%) 60'
12.7.83	77,70	38,24	0,14	0,90	-	-	21,76	61,20	-	-	61,76	62,10
20.7.83	40,50	13,42	0,39	1,09	-	-	58,52	84,65	-	0,42	86,58	86,16
19.8.83	50,80	30,51	1,24	2,07	0,27	0,51	46,04	62,60	0,39	-	69,49	65,18
31.8.83	93,41	50,76	0,29	1,48	-	0,71	6,70	44,12	-	-	49,24	46,31
12.9.83	83,86	41,05	0,34	2,48	0,32	0,38	11,20	56,83	-	-	58,95	59,96
$\bar{x}$	69,25	34,80	0,48	1,60	0,30	0,53	28,84	61,88			65,20	63,88
SE	±10,09	±6,25	±0,19	±0,30	±0,02	±0,10	±10,07	±6,56			±6,24	±6,43

- Im Differenz-Radiogramm nicht nachweisbar

Tab. 6: - 6. Fortsetzung -

Vers. Datum	[B] (%) 30'	[B] (%) 60'	[Met I] (%) 30'	[Met I] (%) 60'	[Met II] (%) 30'	[Met II] (%) 60'	[Met IV] (%) 30'	[Met IV] (%) 60'	[Met x'] (%) 30'	[Met x'] (%) 60'	Abnahme von [B] (%) 60'	Zunahme von [Metaboliten] (%) 60'
IIb: Kontrollratten, ♀ , nach 3-tägiger Enzyminduktion mit 50 mg/kg Phenobarbital, $[B] = 10^{-6}$ mol·l^{-1}												
12.9.83	74,37	42,10	0,55	1,47	0,32	-	22,54	55,61	-	0,77	57,90	57,85
IIc: Kontrollratten, ♀ , $[B] = 10^{-6}$ mol·l^{-1}, $[NADH] = 10^{-3}$ mol·l^{-1}												
12.7.83	74,92	42,11	-	0,67	-	-	26,41	55,55	-	-	57,89	56,22

- Im Differenz-Radiogramm nicht nachweisbar

Tab. 6: - 7. Fortsetzung -

III: Kontrollmäuse, ♂, [B] = 10^{-6} mol·l^{-1}

Vers. Datum	[B] (%) 30'	60'	[Met I] (%) 30'	60'	[Met II] (%) 30'	60'	[Met IV] (%) 30'	60'	[Met x'] (%) 30'	60'	Abnahme von [B] (%) 60'	Zunahme von [Metaboliten] (%) 60'
14. 9.83	/	78,93	/	-	/	0,68	/	19,64	/	-	21,07	20,32
24.10.83	95,99	80,59	-	-	2,75	-	-	17,94	-	-	19,41	17,94
24.10.83	88,98	79,84	-	-	-	-	11,27	20,44	-	-	20,16	20,44
$\bar{x}$	92,48	79,78						19,34			20,21	19,57
SE	±3,50	±0,47						±0,73			±0,48	±0,81

/ Nicht gemessen

- Im Differenz-Radiogramm nicht nachweisbar

7. Literaturverzeichnis

1. Bartholomei, M.S., L.E. Klein, P. Hsiao and Chu S. Lo
Effect of corticosterone and triiodthyronine on (Na-K)-adenosine triphosphatase activity in rat submandibular gland
Pflügers Arch. 769: 1-4, 1983

2. Blair-West, J.R., J.P. Coghlan, D.A. Denton, J.R. Goding and R.D. Wright
The effect of aldosterone, cortisol and corticosterone upon the sodium and potassium content of sheep's parotid saliva
J. of Clinical Investigation 42: 484-496, 1963

3. Bush, I.E.
Species differences in adrenocortical secretion
J. Endocrinol. 9: 95-100, 1953

4. Chao, Han-pu
Vergleich des Corticosteronmetabolismus von Nieren- und Lebergewebe der Ratte in vitro
Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin, 1985

5. Cheyne, V.D.
A discription of the salivary glands of the rat and a procedure for their extirpation
J. Dental Research 18: 257-268, 1939

6. De Nicola, A.F. and V. Dahl
Acute effects of SU-4885 and its reduced derivate (SU-5236) on the adrenocortical secretion of the rat
Endocrinol. 89: 1236-1241, 1971

7. Funder, J.W., Feldman, D., Edelman, I.S.
Specific aldosterone binding in rat kidney and parotid
J. of Steroid Biochemistry 3: 209-218, 1972

8. Guder, W.G., O.H. Wieland
Metabolism of isolated kidney tubules
Eur. J. Biochem. 31: 69-79, 1972

9. Hierholzer, K., Lichtenstein, I., Siebe, H., Tsiakiras, D. and I. Witt
In vitro conversion of corticosterone (B) by rat renal tissue
In: Biochem. of kidney functions, INSERM symp. No. 21, Ed. F. Morel, Elsevier Biomed, Press B.V.: 233-240, 1982

10. Hierholzer, K., Lichtenstein, I., Siebe, H., Tsiakiras, D. and I. Witt
Renal metabolism of corticosteroid hormones
Klin. Wochenschr. 60: 1127-1135, 1982

11. Hierholzer, K., M. Schöneshöfer, H. Siebe, D. Tsiakiras, P. Weskamp
Corticosteroid metabolism in isolated rat kidney in vitro. I. Formation of lipid soluble metabolites from corticosterone (B) in renal tissue from male rats
Pflügers Arch. 400: 363-371, 1984

12. Hoyer, G.-A., D. Tsiakiras, H. Siebe and K. Hierholzer
Corticosteroid metabolism in isolated rat kidney in vitro. III. Structure analysis of lipid soluble metabolites of corticosterone
Pflügers Arch. 400: 377-380, 1984

13. Young, J.A., E.W. van Lennep
Transport in salivary and salt glands
In: Membran Transport in Biology Ed.:
G. Giebisch, D.C. Tostesen und H.H.
Ussing, IV B, Transport Organs,
563-692 (563-565, 648-653), 1980

14. Kraulis, I., M.K. Birningham
Inhibition of the biosynthesis of 18-
hydroxy-11-deoxycorticosterone vy SU-4885
Canadian J. of Biochemistry 43: 1471-1476,
1965

15. Levin, J., Z. Barnett and D.K. Fukushima
Extraadrenal effects of metyrapone in man
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47: 845-849,
1978

16. Schöneshöfer, M., A. Fenner
A convenient and efficient method for the
axtraction and fractionation of steroid
hormones from serum or urine
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19: 71-74,
1981

17. Schöneshöfer, M., A. Fenner and H.J. Dulce
Assessment of eleven adrenal steroids from
a single serum sample by combination of
automatic High-Performance Liquid Chromato-
graphy and Radioimmunoassay
J. Steroid Biochem. 14: 377-386, 1981

18. Siebe, H., D. Tsiakiras and K. Hierholzer with technical assistance of I. Lichtenstein
Corticosteroid metabolism in isolated rat kidney in vitro. II. Sex dependency of metabolism and formation of 11-dehydro-corticosterone
Pflügers Arch. 400: 372-376, 1984

19. Tsiakiras, D., H. Siebe, P. Weskamp and K. Hierholzer
Metabolic conversion of ^{3}H-corticosterone(CS) by the isolated perfused rat kidney
Pflügers Arch. 389: R42, 1981

20. Tsiakiras, D.
Corticosteronmetabolismus in der isoliert perfundierten Niere der Ratte
Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin, 1982

8. Firmenadressen

Deutschland

ALTROMIN, Inst. f. Versuchstierkunde, 3000 Hannover

BAYER AG, 5090 Leverkusen

B. BRAUN MELSUNGEN AG, 3508 Melsungen

CEVA, 2360 Bad Segeberg

HAAKE, Gebr. GmbH, 7500 Karlsruhe

INSTITUT FÜR VERSUCHSTIERKUNDE, 3000 Hannover

Dr. Herbert KNAUER KG, 6370 Oberursel/Ts.

E. MERCK, 6100 Darmstadt

NEW ENGLAND NUCLEAR, 6072 Dreieichenheim
b. Frankfurt/Main

PHARMA HAMELN, 3250 Hameln

SCHERING AG, 1000 Berlin

SCHLEICHER UND SCHÜLL GmbH, 3354 Dassel

Ausland

CENCO INSTRUMENTS, Breda/Die Niederlande

DEC MAYNARD, Massachusetts/USA

GL. BOMHOLTGÅRD, 8680 Ry/Dänemark

LKB, Broma/Schweden

MAKOR CHEMICALS, Jerusalem/Israel

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. K. Hierholzer für die Überlassung des Dissertationsthemas. Die Tätigkeit unter seiner Anleitung ermöglichte mir, den Umgang im wissenschaftlichen Denken und Arbeiten zu erlernen. Seine Ratschläge und seine Kritik waren mir von großem Nutzen.

Frau Dr. Witt danke ich für die Einführung und Einarbeitung in die Methode.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Frau I. Lichtenstein und Herrn H. Siebe für die stete und sehr freundliche Hilfsbereitschaft und die vielen praktischen Ratschläge bei der Durchführung der Experimente.

Herrn Dr. H. Chao und Herrn Dr. N. Kobayashi danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Ebenso gilt mein Dank Frau U. Herrbach.

Lebenslauf

Name:	Alexander Verowski
Geburtsdatum:	19.2.1956
Gebortsort:	Wilna (UdSSR)
Eltern:	Michael Verowski und Ehefrau Eugenia
Schulausbildung:	1963-1973 Allgemeinbildende Schule in Odessa (UdSSR)
Schulabschluß:	Abitur
Umsiedlung nach Deutschland:	1974
Berufstätigkeit:	Mai 1975-Oktober 1979 Angestellter beim Bezirksamt Charlottenburg, Abt. Sport- und Bäderamt
Studium:	1979-1985 Studium der Zahnmedizin an der Freien Universität Berlin
Approbation als Zahnarzt:	März 1985
Berufstätigkeit:	Seit dem 1.4.85 Assistenzzahnarzt in der Praxis von P. Rohleder Nonnendammallee 99, 1000 Berlin 13

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen